

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18461

研究課題名(和文) 受容体型チロシンキナーゼALKの神経軸索再生に対する機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of receptor tyrosine kinase ALK for neural axon regeneration

研究代表者

町野 正明 (Machino, Masaaki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70807510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の1つである未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)の神経軸索に対する役割を解明するために、ALK阻害剤であるASP3026とアゴニストであるモノクローナル抗体(mAb16-39)をHEK293T細胞株に投与し、リン酸化ALKの発現を免疫染色とWestern blotting法にて確認した。ASP3026投与にて濃度依存性にリン酸化ALKの発現は低下し神経軸索伸長とsproutingは抑制されることを確認した。またmAb16-39投与にてALKの発現は上昇し神経軸索伸長とsproutingは亢進することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経軸索再生の分子機構は十分に解明されていないのが現状である。神経系において特異的に発現の見られる受容体型チロシンキナーゼ(RTK)およびそれらのリガンドは、神経系の発生、分化、生存維持など多彩な生物学的機能を有している。未分化リンパ腫キナーゼ(RTK)の1つであり、特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ受容体として機能するとされるが、詳しい機能ははまだ不明である。本研究は神経軸索再生を主眼においているが、本研究のもたらす成果は、生理的可塑性の分子基盤の解明など、神経科学にブレイクスルーをもたらす可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a receptor type tyrosine kinase (RTK) that is expressed in neurons of the central and peripheral nervous systems. We investigated whether the ASP3026 as inhibitor of ALK and knocking down of ALK by siRNA suppress the outgrowth of adult mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons, whether monoclonal antibody (mAb) 16-39 as an agonist of kinase activity of ALK promote axon outgrowth. In cultured DRG neuron, ALK was activated in elongating growth cones and sprouting axonal branches. Inhibition of ALK by ASP3026, reduced axonal elongation and branching in adult neurons. Inactivation of ALK by siRNA, reduced axonal elongation and branching in adult neurons. In contrast, mAb16-39 induced tyrosine phosphorylation of ALK, activation of ALK by mAb16-39, and promoted axonal elongation and sprouting. ALK significantly enhanced axonal elongation and branching. Taken together, our data indicate pivotal roles of RTK pathway in neural development or its repair.

研究分野：神経科学

キーワード：神経軸索 受容体型チロシンキナーゼ ALK 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系において特異的に発現の見られる容体型チロシンキナーゼ (RTK) およびそれらのリガンドは、神経系の発生、分化、生存維持など多彩な生物学的機能を有している。未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) もまた神経系に特異的に発現する RTK であり、今まで未分化大細胞型リンパ腫の融合遺伝子として研究されてきた。分子構造および発現パターンの解析から、ALK は特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ神経栄養因子、または軸索誘引・反発作用などを持つ位置情報因子に対する受容体として機能していることが期待されるが、ALK に対するリガンドは現在未同定でありその詳しい機能は不明である。

2. 研究の目的

ALK はまだリガンドの知られていない数少ない「オーファン (孤児)」受容体の 1 つである。リガンドに媒介される RTK の活性化は発生の至る所で重要になる。ALK は特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ受容体として機能するとされるが、詳しい機能はいまだ不明である。本研究の目的は神経軸索伸長における ALK の役割を解析することである。また ALK のリガンドを特定し、神経軸索に対する作用を解明する。神経軸索再生における ALK の役割を分子生物学的、生化学的手法を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) ALK の中枢神経における発生学的な発現を確認するために C57BL/6J マウス全脳における mRNA 発現を胎児期から出生後まで測定する。

またマウス後根神経節 DRG (dorsal root ganglion) から抽出した初代培養ニューロンを用いて神経軸索におけるリン酸化 ALK の発現を免疫染色にて観察する。

(2) ALK 阻害剤である ASP3026 を HEK293T 細胞株に投与しリン酸化 ALK の発現を免疫染色と Western blotting 法にて確認する。

DRG ニューロンに ASP3026 を投与し神経軸索長と神経 sprouting を定量的に評価する。

(3) アゴニストであるモノクローナル抗体 (mAb16-39) を HEK293T 細胞株に投与しリン酸化 ALK の発現を免疫染色と Western blotting 法にて確認する。

DRG ニューロンに mAb16-39 を投与し神経軸索長と神経 sprouting を定量的に評価する。

(4) N2a 細胞株に shRNA を用いた ALK の knock down を行い、qRT-PCR にて ALK の mRNA を確認する。ALK の Knock down 有無による DRG ニューロンの神経軸索長と sprouting を比較検討する。

(5) 表面プラズモン共鳴 (SPR)・質量分析計を用いて精度の高いターゲットの捕捉を狙う。リガンド候補 (コンドロイチン硫酸 CS-A、CS-B、CS-C、CS-D、CS-E、ケラタン硫酸 KS、ヘパラン硫酸 HS) との相互作用を解析する。同定されたリガンド候補を HEK293T 細胞株に投与しリン酸化 ALK の発現を免疫染色と Western blotting 法にて確認する。リガンド候補のコア蛋白を用いて同様の実験を行う。DRG (dorsal root ganglion) から抽出した初代培養ニューロンを用いて神経軸索伸長を投与群と非投与群にて定量的に比較検討する。また初代培養ニューロン軸索尖端におけるリン酸化 ALK の発現を免疫染色にて観察する。

4. 研究成果

(1) ALK の発生学的な mRNA の発現は qRT-PCR にて出生直後がピークであった。

神経軸索成長円錐尖端でリン酸化 ALK の発現が亢進していることを免疫染色法にて確認した。

(2) ASP3026 投与にて濃度依存性にリン酸化 ALK の発現が低下することを Western blotting 法にて確認した (図 1)。

ASP3026 投与にてコントロールと比べ有意に神経軸索伸長と sprouting は抑制されることを免疫染色法にて確認した (図 2)。

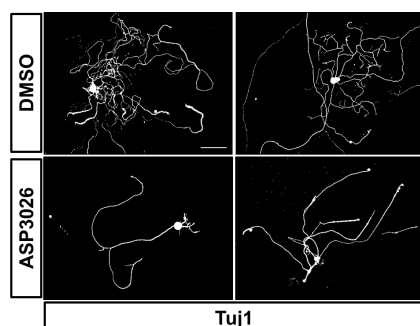


図 1. ASP3026 による軸索伸長抑制

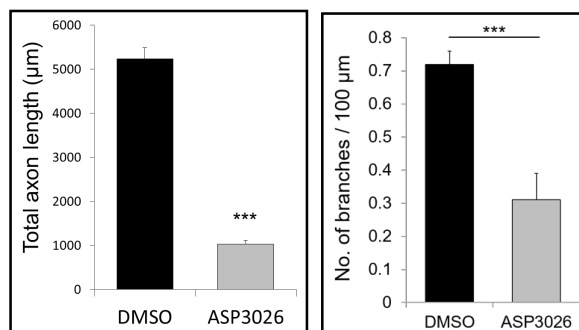


図 2. 軸索伸長抑制と sprouting 抑制

(3)mAb16-39 投与にてリン酸化 ALK の発現が上昇することを Western blotting 法にて確認した (図 3)。mAb16-39 投与にてコントロールと比べ有意に神経軸索伸長と sprouting は亢進することを免疫染色法にて確認した (図 4)。

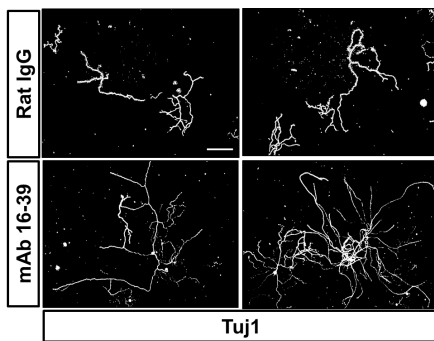


図 3. mAb16-39 による軸索伸長亢進

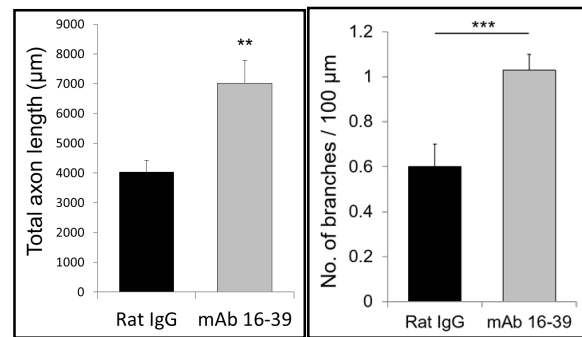


図 4. 軸索伸長亢進と sprouting 亢進

(4)N2a 細胞株に siRNA を用いた ALK の knock down を行い、qRT-PCR にて ALK の mRNA を確認した (図 5)。ALK の Knock down 有無による DRG ニューロンの神経軸索長を比較検討した結果、ALK を Knock down することで神経軸索伸長は有意に抑制された (図 6)。

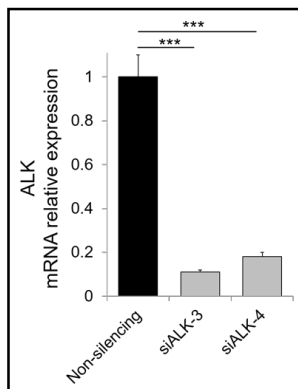


図 5. ALK ノックダウン

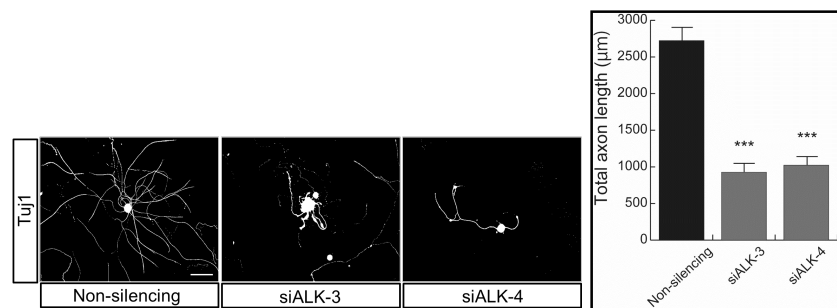


図 6. ALK ノックダウンによる軸索伸長抑制

(5)SPR にて ALK と分子間相互作用のあるプロテオグリカン(コア蛋白)を同定した。CS-B(デルマタン硫酸)が最も相互作用が強いことを確認した(図 7)。デルマタン硫酸は ALK に結合する新たなリガンドであり、ALK を活性化する機能を有することが予想される。デルマタン硫酸とそのコア蛋白は ALK の活性化を誘導し軸索伸長に寄与しており、今後神経再生研究に応用できることが期待される。

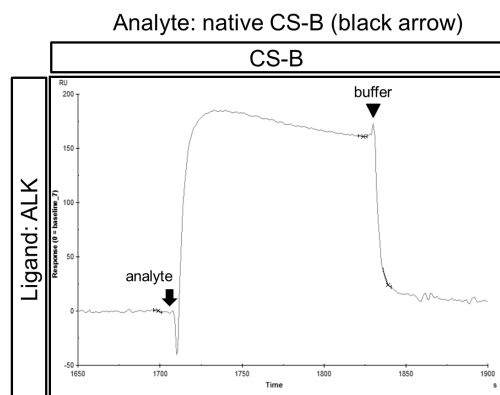


図 7. ALK と CS-B の分子間相互作用

今後の実験計画として、デルマタン硫酸のコア蛋白である Biglycan と Decorin 投与にて濃度依存性にリン酸化 ALK の発現があるか確認する。コア蛋白投与群で神経軸索成長円錐先端においてリン酸化 ALK の発現が亢進するか検証する。コア蛋白投与群で神経軸索が伸長することが予想される。

ALK は神経系の発達・維持に寄与していることが明らかとなった。また ALK の活性化は神経軸索伸長と神経 sprouting を促進し、ALK 不活化は軸索伸長と sprouting を抑制する作用を示していた。この知見は ALK の活性を調節している機構を解明し、ALK を標的とする脊髄再生治療法を開発するための手法を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Machino Masaaki, Gong Yuanhao, Ozaki Tomoya, Suzuki Yuji, Watanabe Eri, Imagama Shiro, Kadomatsu Kenji, Sakamoto Kazuma	4. 巻 170
2. 論文標題 Dermatan sulphate is an activating ligand of anaplastic lymphoma kinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 631 ~ 637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------